

## Abstract

Light plays a fundamental role in controlling plant development throughout the entire life cycle. Plants must dynamically adapt to changes in ambient light conditions. Such adaptive mechanisms are underpinned by complex regulatory networks for the detection and transduction of light signals. A central regulator of light signaling in Arabidopsis is the E3 ubiquitin ligase COP1/SPA. COP1/SPA is primarily active in the dark when it polyubiquitinates transcription factors that are important for light responses, thereby causing their degradation. These transcription factors share a valine-proline (VP) motif that is bound by a COP1 VP-binding pocket. In the light, photoreceptors directly interact with COP1/SPA, thereby suppressing its activity, resulting in the accumulation of light-responsive transcription factors, such as HY5 and PAP2. Like the COP1/SPA substrates, the two blue light photoreceptors CRY1 and CRY2 harbor a VP motif in their C-termini. CRY2 uses its VP motif to outcompete transcription factors from COP1, thereby preventing them from degradation. CRY1 also interacts with COP1. However, whether CRY1 utilizes the same VP-mediated mechanism to inhibit the COP1/SPA complex activity is yet unknown. In this thesis, I showed that the VP1 motif of CRY1 is essential for interaction with COP1 *in planta*. Through phenotypic analysis of transgenic Arabidopsis lines harboring a mutation in the VP1 motif, I revealed that the VP1 motif of CRY1 is crucial for blue light-induced responses, such as seedling de-etiolation and anthocyanin biosynthesis. Moreover, I showed that CRY1 inhibits COP1 activity by utilizing its VP1 motif to competitively displace the COP1/SPA substrates PAP2 and HY5 from COP1. I generated CRY1-VP1 chimeras in which the VP1 motif of CRY1 is replaced with the human TRIB1 VP motif, which is known to interact with Arabidopsis COP1 *in vitro*. By phenotypic analysis of the chimeric lines, I demonstrated their functionality in blue light signaling, which further supports the biological relevance of this VP-mediated displacement mechanism. Additionally, I showed that SPA1 forms, similarly to COP1, a VP-binding pocket to bind PAP2 via the VP2 motif of PAP2. Colocalization competition assays indicated that CRY2 can disrupt the SPA1-PAP2 interaction. Since earlier studies showed that the VP motif of CRY2 is important for interaction with SPA1, the results suggest that CRY2 also utilizes the VP-mediated displacement mechanism to outcompete substrates from SPA1, suggesting a conserved mechanism in the inhibition of the COP1/SPA complex. Not only cryptochromes but also the red-light photoreceptors phytochromes harbor VP motifs in their protein sequence. I could show that phyA can disrupt SPA1-PAP2

interaction, suggesting that phyA plays a role in the VP-mediated inhibition of the COP1/SPA complex. In summary, the first part of this thesis reveals that different photoreceptors and substrates of the COP1/SPA complex compete for binding to COP1 and SPA1 via a conserved mechanism, contributing to the understanding of the molecular basis of light signaling in Arabidopsis. In the second part of this thesis, I investigated which subdomains of the SPA1 N-terminal domain are responsible for the interaction with cryptochromes. I revealed the presence of multiple binding sites and amino acids within the SPA1 N-terminal domain that are responsible for binding the N-terminal PHR domains of CRY1 and CRY2. However, the functionality of these interactions remains to be investigated.

## Zusammenfassung

Licht spielt eine grundlegende Rolle bei der Steuerung der Pflanzenentwicklung während des gesamten Lebenszyklus einer Pflanze. Um sich an Veränderungen der umgebenden Lichtbedingungen anzupassen, haben Pflanzen komplexe regulatorische Netzwerke zur Erkennung und Übertragung von Lichtsignalen entwickelt. Ein zentraler Regulator der Lichtsignaltransduktion ist die E3-Ubiquitin-Ligase COP1/SPA. COP1/SPA ist hauptsächlich in der Dunkelheit aktiv, wo es Transkriptionsfaktoren, die für die Lichtantwort der Pflanzen wichtig sind, polyubiquitiniert, und somit zu deren Abbau führt. Diese Transkriptionsfaktoren teilen ein Valin-Prolin (VP)-Motiv, das von einer COP1-VP-Bindungstasche gebunden wird. Im Licht interagieren Photorezeptoren direkt mit COP1/SPA, um dessen Aktivität zu unterdrücken, wodurch die Akkumulation von Transkriptionsfaktoren, wie HY5 und PAP2, führt. Ähnlich den COP1/SPA-Substraten tragen beide Blaulicht-Photorezeptoren CRY1 und CRY2 ein VP-Motiv in ihren C-termini. CRY2 nutzt sein VP-Motiv, um Transkriptionsfaktoren von der COP1-Bindestelle zu verdrängen und somit deren Abbau zu verhindern. CRY1 interagiert ebenfalls mit COP1. Ob CRY1 jedoch denselben VP-vermittelten Mechanismus zur Inhibierung der COP1/SPA-Komplexaktivität nutzt, ist bisher unbekannt. In dieser Arbeit habe ich gezeigt, dass das VP1-Motiv von CRY1 essentiell für die Interaktion mit COP1 *in planta* ist. Durch phänotypische Analysen von transgenen Arabidopsis-Linien, die eine Mutation im VP1-Motiv tragen, habe ich gezeigt, dass das VP1-Motiv von CRY1 für blaulicht-induzierte Reaktionen, wie die De-etiolierung von Keimlingen und Anthocyanbiosynthese entscheidend ist. Darüber hinaus habe ich gezeigt, dass CRY1 die Aktivität von COP1 hemmt, indem es sein VP1-Motiv nutzt, um die COP1/SPA-Substrate PAP2 und HY5 aus der Bindung mit COP1 zu verdrängen. Ich habe CRY1-VP1-Chimären erzeugt, bei denen das VP1-Motiv von CRY1 durch das humane TRIB1 VP-Motiv ersetzt wurde, das bekanntermaßen *in vitro* mit Arabidopsis COP1 interagiert. Durch phänotypische Analysen der chimären Linien konnte ich deren Funktionalität in der Blaulichtantwort nachweisen, was die biologische Relevanz des VP-vermittelten Verdrängungsmechanismus weiter unterstützt. Zusätzlich habe ich gezeigt, dass SPA1, ähnlich wie COP1, eine VP-Bindetasche bildet, um PAP2 über das VP2-Motiv von PAP2 zu binden. Eine Co-Lokalisationsstudie deutet darauf hin, dass CRY2 die SPA1-PAP2-Interaktion inhibieren kann. Da frühere Studien gezeigt haben, dass das VP-Motiv von CRY2 wichtig für die Interaktion mit SPA1 ist, legen die Ergebnisse nahe, dass CRY2 den VP-vermittelten Verdrängungsmechanismus auch nutzt, um Substrate von SPA1 zu verdrängen, was auf einen

konservierten Mechanismus zur Hemmung der COP1/SPA-Komplexes hinweist. Nicht nur Cryptochrome, sondern auch die Rotlicht-Photorezeptoren Phytochrome tragen VP-Motive in ihrer Proteinsequenz. Ich konnte zeigen, dass phyA die Fähigkeit hat, die SPA1-PAP2-Interaktion zu hemmen, was darauf hindeutet, dass phyA möglicherweise eine Rolle bei der VP-vermittelten Hemmung des COP1/SPA-Komplexes spielt. Zusammenfassend zeigt der erste Teil dieser Arbeit, dass verschiedene Photorezeptoren und Substrate des COP1/SPA-Komplexes über einen konservierten Mechanismus um die Bindung an COP1 und SPA1 konkurrieren. Im zweiten Teil dieser Arbeit habe ich untersucht, welche Unterdomänen des N-Terminale Domäne von SPA1 für die Interaktion mit Cryptochromen verantwortlich sind. Ich habe das Vorhandensein mehrerer Bindungsstellen und Aminosäuren in der N-Terminale Domäne von SPA1 aufgedeckt, die für die Bindung an die N-terminalen PHR-Domänen von CRY1 und CRY2 verantwortlich sind. Allerdings muss die Funktionalität dieser Interaktionen noch weiter untersucht werden.